

## 内容の要旨及び審査結果の要旨

【書式 1 1】

平成 31 年 2 月 5 日

氏名（本籍）	酒井 博之			
学位の種類	博士（工学）			
学位記番号	甲 第 167 号			
学位記の授与日	平成 31 年 3 月 18 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 創価大学大学院学則第 31 条第 2 項該当 創価大学学位規則第 3 条の 3 第 1 項該当			
論文題目	Isolation, characterization and genome analysis of novel thermoacidophilic archaea from an acidic terrestrial hot spring in Japan			
論文審査機関	工学研究科委員会			
論文審査委員	主査委員	博士（学術）	黒沢 則夫	印
	委 員	工学博士	清水 昭夫	印
	委 員	博士（農学）	伊藤 隆	印

＜論文の内容の要旨＞

好熱好酸性アーキアは、高温、強酸性下で機能する産業上有用な極限酵素の分離源として注目されており、アーキアの遺伝学的解析や、生物の極限環境への適応メカニズムを研究するためのモデル生物としても利用されている。新規の好熱好酸性アーキアを分離・記載する事は、様々な基礎および応用研究のためのバイオリソースを開拓し研究者間で共有する上で重要である。一方酸性温泉には多様な未培養の好熱好酸性アーキアが生息している事が明らかとなっているが、この半世紀に酸性温泉から分離・記載された好熱好酸性アーキアはわずか 17 属 37 種である。また、好熱好酸性アーキアの中には分類学的整理の必要な系統群が存在する (*Sulfolobales* 目)。本論文では、好熱好酸性アーキアの中でも特に *Sulfolobales* 目の分類学的研究を進める事を目的として、(1) 従来よりも効率的に新規好熱好酸性アーキアを分離する為の新規分離培養手順を考案し、(2) 分離に成功した新規好熱好酸性アーキアを記載する為の多相分類学的解析および *Sulfolobales* 目の分類体系の再構築を行い、(3) 新属新種アーキア *Sulfodiicoccus acidiphilus* のゲノム解析を行った結果が述べられている。

本論文は 6 章から構成されている。第 1 章は総合序論として、アーキア研究の重要性、酸性温泉に着目した理由、好熱好酸性アーキアの分類学の歴史、*Sulfolobales* 目アーキアの分類学上の問題点、原核生物を記載する意義について述べられている。第 2 章では、新規分離培養手順 ENFE (Exploring Novel microorganisms in Frozen Enrichment cultures) 法の確立と、この方法により箱根大涌谷酸性温泉から *Sulfolobales* 目に属す新属のアーキア(HS-1 株)と新種のアーキア(HS-3 株) を分離する事に成功した結果が述べられている。第 3 章では、HS-1 株を記載する為の多相分類学的解析を行った結果が述べられている。HS-1 株は、単体硫黄によって顕著な増殖阻害を受け、独立栄養的に増殖せず、DNA の G+C 含量が比較的高いといった点で、他の *Sulfolobales* 目アーキアとは異なる性状を持つ事が明らかにされた。以上の結果から、HS-1 株は *Sulfolobales* 目の新属新種アーキア *Sulfodiicoccus acidiphilus* として正式記載された。第 4 章では、HS-3 株の多相分類学的解析とともに、本株の近縁種である *S. solfataricus* 及び *S. shibatae* の表現型について再評価を行った結果が述べられている。HS-3 株、*S. solfataricus* および *S. shibatae* は、硫黄 (S<sup>0</sup>) を酸化しない通性嫌気性のアーキアであり、進化系統学的にも *Sulfolobus* 属とは異なる事が明確に示された。その結果、この 3 種には新たな属名 *Saccharolobus* を与える事が提唱され、HS-3 株は *Saccharolobus* 属

の新種のアークア *Saccharolobus caldissimus* として正式記載された。第 5 章では、新属新種のアークア *Sulfodiicoccus acidiphilus* (HS-1 株) の全ゲノム配列を決定し、その遺伝学的特徴を詳細に明らかにした結果が述べられている。HS-1 株は複製開始に関わる遺伝子 (*cdc6*) の数が少ない事、独立栄養的増殖に関わる代謝経路および DNA ポリメラーゼをコードする遺伝子の 1 つ (*polB3*) を持たないといった点で、これまで知られているいずれの *Sulfolobales* 目アークアとも異なる遺伝学的特徴を持つ事が明らかにされた。第 6 章では、総合考察として、従来の分離培養手順と ENFE 法の比較、ENFE 法をさらに改善する為の考え、微生物の集積培養条件と至適生育条件に関する考察、ENFE 法によって得られたその他の最近の研究成果、*Sulfolobales* 目アークアの最新の分類体系とその展望、および本論文の総括的な結論が述べられている。

本論文の内容の一部は、下記の査読制度を有する権威ある学術雑誌に 3 編が掲載されており、本論文の研究成果が国際的にも評価されている事を示している。

1. Hiroyuki D. Sakai and Norio Kurosawa.

Exploration and isolation of novel thermophiles in frozen enrichment cultures derived from a terrestrial acidic hot spring. *Extremophiles*. Vol. 20: pp. 207-214, 2016.

2. Hiroyuki D. Sakai and Norio Kurosawa.

*Sulfodiicoccus acidiphilus* gen. nov., sp. nov., a sulfur-inhibited thermoacidophilic archaeon belonging to the order *Sulfolobales* isolated from a terrestrial acidic hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 67: pp. 1880-1886, 2017.

3. Hiroyuki D. Sakai and Norio Kurosawa.

*Saccharolobus caldissimus* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic iron-reducing hyperthermophilic archaeon isolated from an acidic terrestrial hot spring, and reclassification of *Sulfolobus solfataricus* as *Saccharolobus solfataricus* comb. nov. and *Sulfolobus shibatae* as *Saccharolobus shibatae* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 68: pp. 1271-1278, 2018.

<論文審査結果の要旨>

*Sulfolobales* 目は、古くから知られるアークア系統群の 1 つである。これまで様々な基礎および応用研究が本系統群の記載種を用いて行われてきた。一方、その分類学的研究はこの 20 年間ほとんど進んでいない。加えて、本系統群には再分類が必要な系統 (*Sulfolobus* 属) が存在した。この事は 1996 年より複数の研究者によってたびたび指摘されてきたが、表現型の違いによる明確なグループ分けができなかったために、分類学的整理は行われてこなかった。これに対して本論文では、まず新規な微生物をより確実に分離する為の新規分離培養手順 ENFE 法が考案された。ENFE 法を用いて分離に成功した 2 株の新規アークアは、それぞれ *Sulfolobales* 目では 19 年ぶりとなる新属アークアの記載となり、また *Sulfolobus* 属の分類学上の問題を解決する事に繋がった。また、*Sulfodiicoccus acidiphilus* HS-1 株のゲノム解析により、本種が *polB3* を持たない初めてのクレンアークアである事を明らかにし、アークアにおける DNA ポリメラーゼの役割と進化を考察する上で重要な 1 つの知見を提供した。本論文で考案された ENFE 法は、酸性温泉だけではなく、あらゆる環境に生息する微生物に対しても利用可能な分離培養手順であり、今後の微生物分類学や微生物生態学分野に大きく貢献する。また、新たに記載した 2 種の新規アークアは、人類が恒久的に利用可能な生物資源として日本およびインドネシアの微生物保存機関に寄託されており、今後の好熱好酸性アークアの基礎および応用研究の発展に永続的に貢献する。以上のことから、本論文は博士 (工学) として十分な価値を有するものと認める。

最終試験の結果の要旨

【書式 1 2】

平成 31 年 2 月 5 日

フリガナ 申請者氏名	サカイ ヒロユキ 酒井 博之	専 攻 名	環境共生工学専攻
審査委員会委員	主査委員	黒沢 則夫	印
	委 員	清水 昭夫	印
	委 員	伊藤 隆	印
<p>要旨</p> <p>審査委員 3 名により、学位論文の内容および関連する学問分野に関して口頭で試問を行った。その結果、申請者が博士（工学）としての十分な学力と研究能力を有するものと判定された。よって、審査委員会は最終試験の結果を合格と認定した。</p>			